

Würzburg 1959

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Dr. W. Neumann

BEITRÄGE ZUR QUANTITATIVEN AUFTRENNUNG VON PROTEINGEMISCHEN
DURCH ELEKTROPHORESE IN STÄRKEGEL
(UNTERSUCHUNGEN AN SERUMALBUMIN, BIENEN- UND GASBRANDGIFT)

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Brunhilde Marta Szopa geb. Gröschl
aus Aussig (Böhmen)

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

Würzburg 1959

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n

BEITRÄGE ZUR QUANTITATIVEN AUFTRENNUNG VON PROTEINGEMISCHEN
DURCH ELEKTROPHORESE IN STÄRKEGEL
(UNTERSUCHUNGEN AN SERUMALBUMIN, BIENEN- UND GASBRANDGIFT)

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius - Maximilians - Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
vorgelegt von

Brunhilde Marta Szopa geb. Gröschl
aus Aussig (Böhmen)

Würzburg 1959

Referent: Privatdozent Dr. E. H a b e r m a n n

Korreferent: Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n

Tag der Promotion:

1. 4. 59

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. Einleitung	1
II. Problemstellung	4
III. Eigene Versuche:	6
A) Methodik der Stärkegel-Elektrophorese	6
B) Versuche zur quantitativen Erfassung elektrophoretisch getrennter Komponenten	10
1. Direkte Photometrie	10
2. Quantitative Bestimmung nach Auflösung des Stärkegels	12
C) Auftrennung einiger Proteingemische	21
1. Humanalbumin	21
2. Hundeserum	22
3. Gasbrandgift	26
4. Bienengift	33
IV. Besprechung	33
V. Zusammenfassung	36
VI. Literaturverzeichnis	I



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153517_0199

In neuerer Zeit haben zonenelektrophoretische Verfahren große Bedeutung für analytische und präparative Zwecke erlangt. Die Wahl der Trägermedien spielt dabei eine bei vielen Fragestellungen entscheidende Rolle, weil durch Adsorptions- und elektrostatische Kräfte die Beweglichkeit der zu trennenden Substanzen eingeschränkt wird und so häufig Spektren erhalten werden, die sich von denen nach freier Elektrophorese deutlich unterscheiden. Die Suche galt infolgedessen bisher stets solchen Trägermedien, die möglichst geringe Abweichungen vom als ideal angesehenen Bild der freien Elektrophorese verursachten.

Bei der von SMITHIES 1955 eingeführten Elektrophorese in Stärkegel treten jedoch - obgleich es sich um ein typisches zonenelektrophoretisches Verfahren handelt - ganz neue, für die Trennung wesentliche Faktoren auf. Beispielsweise erhält man aus Serum je nach Herkunft und insbesondere bei Anwesenheit von Hämoglobin eine wechselnde, stets aber größere Zahl von zudem meist schärfer voneinander abgesetzten Fraktionen als dies bei allen anderen Verfahren der Fall ist. Hier wirkt das Trägermedium also nicht nur als Stabilisator elektrophoretischer Zonen gegen Diffusionseffekte, sondern es beeinflusst auch die Ausbildung dieser Zonen.

Auf den ersten Blick könnte es scheinen, als ob mit dieser Stärkegel-Elektrophorese alle übrigen Elektrophoreseverfahren entwertet würden - dies ist jedoch nicht der Fall. Nicht nur ist die Methode relativ kompliziert, auch die Brauchbarkeit ist beschränkt, weil Proteine von besonders hohem Molekulargewicht, wie Fibrinogen und Gamma-Globuline in das Gel nicht ausreichend einzudringen vermögen bzw. sich im Gel nicht ausreichend auftrennen. Außerdem besteht bis heute keine Möglichkeit, die elektrophoretischen Fraktionen präparativ in befriedigender Ausbeute wieder zu erhalten.

Immerhin wurde in den letzten Jahren mit diesem Verfahren eine Reihe von biochemischen Problemen erfolgreich angegangen.

Schon SMITHIES hatte eine größere Anzahl von normalen menschlichen Seren untersucht und diese in 3 Gruppen eingeteilt, die durch das Vorhandensein bestimmter, mit den klassischen Elektrophoresemethoden nicht nachweisbarer Eiweißfraktionen gekennzeichnet sind. Diese als Haptoglobine bezeichneten Proteine haben die gemeinsame Eigenschaft, dem Serum hinzugefügtes Hämoglobin zu binden. In späteren Arbeiten, die SMITHIES zusammen mit POULIK bzw. WALKER durchführte, wurden anhand von zweidimensionalen Pherogrammen Vergleiche zwischen Papier- und Stärkegel-Elektrophorese gezogen. Es stellte sich dabei heraus, daß papierelektrophoretisch "einheitliche" Fraktionen im Stärkemedium häufig mehrere scharf abgesetzte Banden ergaben. Anhand von Familienuntersuchungen wurde aufgezeigt, daß die Zugehörigkeit zu den einzelnen Serumgruppen durch Erbfaktoren bestimmt wird. HARRIS,

ROBSON und SINISCALCO bestätigten dies durch Serumuntersuchungen an weiteren 107 Familien.

OWEN und GOT konnten mittels Störkegel-Elektrophorese fetales von Erwachsenenhäoglobin trennen. ASHTON untersuchte eine größere Reihe von Säugetierseren vergleichend und beschrieb später genetisch bedingte Unterschiede der Serumproteine bei Rindern mit Einzelheiten über die Verteilung der Phänotypen bei Kreuzung. LATNER und ZAKI prüften die Vitamin B₁₂ - Bindung der Serumproteine von Human- und Tierseren.

FINE und CREYSSLER konnten in Seren von Patienten mit Plasmocytomen stärkegelelektrophoretisch typische Bänder in verschiedenen Positionen nachweisen, während bei den von ihnen untersuchten Fällen von Makroglobulinämie keine charakteristischen Fraktionen zu finden waren, ein Befund, der - wie schon früher im Falle des Fibrinogens erwähnt - auf das Verhältnis zwischen der Porengröße des Gels und der Größe der Proteinmoleküle zurückgeführt werden könnte.

Außer Seren, Hämoglobin, Liquor cerebrospinalis (PERT und KUTT) und Eiweißfarbstoffen (FRANGLIN und GOSSELIN) wurden auch die Proteinkomponenten von Toxinen mit der neuen Methode untersucht. POULIK und POULIK konnten den Letalfaktor des Diphtherietoxins von anderen Komponenten abtrennen.

Einige in der vorliegenden Arbeit näher geschilderte Befunde und insbesondere die von uns ausgearbeiteten quantitativen Bestimmungsmethoden, befinden sich als kurze Originalmitteilung (HABERMANN und SZOPA) im Druck.

II. Problemstellung.

Unsere Untersuchungen gingen von der Tatsache aus, daß bisher die Handhabung und vor allem die quantitative Auswertung der in Stärkegel zu erhaltenden Pherogramme in verschiedener Hinsicht noch nicht befriedigt.

Das Stärkegel wird bei der an die Elektrophorese anschließenden Proteinfärbung opak und bricht leicht, sodaß es nicht nur für eine photometrische Auswertung ungeeignet wird, sondern auch schwierig aufzubewahren ist.

Durch die von VESSELINOVITCH angegebene Methode, bei der die Streifen 30 Sek. in 10% Essigsäure gekocht und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt werden, erzielt man zwar eine ausreichende Transparenz, jedoch sind die Streifen dann sehr schwierig zu handhaben, weil sie durch diese Prozedur sehr weich und zerfließlich werden; sie quellen so stark auf, daß sie sich nicht mehr zur Einführung in die gebräuchlichen Photometer eignen. Zur Aufbewahrung müssen die Streifen wieder in die Entfärberlösung gelegt werden. Sie verlieren so die Transparenz und nehmen ihre ursprüngliche Konsistenz wieder an.

FINE und WASZCZENKO betten eine 1 mm dicke Schicht des gefärbten Stärkegels in Agar-Agar ein. Durch 48-stündiges Trocknen bei 37° erhält man zwar sehr dünne transparente Filme, die aber schon während des Trocknens Risse bekommen und sich von der tragenden Glasplatte nicht ohne Beschädigung abziehen lassen.

PERT und KUTT haben die Elektrophorese in Stärkegel zu Untersuchungen von Cerebrospinalflüssigkeit herangezogen

und eine quantitative Auswertung der Streifen auf reflektometrischem Wege, wie sie schon von TURBA für die Auswertung von Papierchromatogrammen angegeben wurde, vorgenommen. Dazu ist allerdings außer einem Photometer zur automatischen photographischen Registrierung noch ein Sekundärelektronen-Vervielfacher nötig.

Unser Ziel war die Ausarbeitung zweier verschiedener quantitativer Methoden:

- a) Wir versuchten die Elektrophoresestreifen unter Vermeidung der Nachteile früherer derartiger Prozeduren transparent zu machen und dann auf übliche Weise im durchfallenden Licht zu photometrieren.
- b) Nach den Erfahrungen bei der Papierelektrophorese (TURBA) ist die Elution des Farbstoffs und seine Photometrie in Lösung der Bestimmung auf bzw. im Träger überlegen. Deshalb stellten wir uns die Aufgabe, den im Stärkegel durch Protein gebundenen Farbstoff quantitativ in Lösung zu bringen.

Neben diesen methodischen Gesichtspunkten interessierte uns gleichzeitig die Frage, ob und in welchem Prozentsatz sich - nach Auftrennung von tierischen und bakteriellen Giften durch Stärkegel-Elektrophorese - deren verschiedene Wirkkomponenten aus dem Gel wiedergewinnen lassen. Nach SMITHIES soll durch Einfrieren die Struktur des Gels zerstört und das Herauslösen der Proteine erleichtert werden. Nach Abzentrifugieren kann der Rückstand mit dem Lösungsmittel noch einmal ausgewaschen und erneut zentrifugiert werden, um die Ausbeute zu verbessern. Allerdings werden von SMITHIES keine Daten zur quantitativen Wiedergewinnung der von ihm untersuchten Proteine

angegeben.

III. Eigene Versuche.

A) Methodik der Stärkegel-Elektrophorese.

Im allgemeinen wurde von uns nach der von SMITHIES angegebenen Methode zur Elektrophorese und Anfärbung verfahren. In Einzelheiten weicht jedoch unsere Arbeitsweise erheblich ab, weshalb sie im Zusammenhang wiedergegeben wird.

Zur Bereitung des Stärkegels wurde Kartoffelstärke der Fa. C.F. Hildebrandt, Mühlenwerke und Stärkefabriken (Hamburg) verwendet, für die sich allerdings die von SMITHIES angegebene Zeitdauer der Hydrolyse von 45 Min. als zu kurz erwies. Gele aus verschiedenen Stärkechargen verhielten sich bei gleicher Hydrolysendauer sehr unterschiedlich, sowohl hinsichtlich der Konsistenz als auch der Trennfähigkeit, was besonders gegen Ende unserer Versuche (Januar 1959) im Vergleich zum Beginn (September 1958) deutlich wurde.

Brauchbare Konsistenz und gute Trennfähigkeit des Gels wurde auf folgende Weise erreicht: 200 g Kartoffelstärke wurden in 400 ml Aceton - HCl (1 Vol. konz. HCl auf 100 Vol. Aceton) bei 37° suspendiert und für die Dauer von 3 Stunden auf dieser Temperatur gehalten. Anschließend wurde die Reaktion durch Zusatz von 100 ml einer molaren Natriumacetat-Lösung gestoppt. Dann wurde die Stärke filtriert, ausreichend mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Aceton entwässert und bei 40 bis 45° getrocknet.

Von der so hydrolysierten Stärke wurden 14 g mit 100 ml eines Boratpuffers (0,03 m Borsäure + 0,012 m NaOH; pH 8,5) versetzt und in einem Glaskolben über der offenen Flamme unter kräftigem Schwenken bis zum Siedepunkt erhitzt, dann mittels Wasserstrahlpumpe 1-2 Sek. evakuiert, um die Luftblasen aus dem Gel zu entfernen. Der Wasserverlust ist dabei unbedeutend. Das heiße Gel wurde in eine Kunststoffform (5 : 33 : 193 mm) gegossen, die überstehende Masse mit einem Spatel abgestreift. Wenn sich nach dem Erkalten das Gel verfestigt hatte, wurde das zu untersuchende Proteingemisch eingebracht. Es ist wichtig, das Gel nach dem Erkalten sofort (z.B. mit Parafilm) zu bedecken, da sonst durch Wasserverlust Änderungen der elektrophoretischen Eigenschaften eintreten. Wenn das Gel hiergegen geschützt wird, kann es eventuell 2 Tage lang aufgehoben werden, besser ist es aber, immer ein frisch vorbereitetes Gel zu benutzen.

Das Einbringen des zu untersuchenden Materials kann auf verschiedene Art und Weise (SMITHIES) geschehen:

1. Stärkekornmethode.

Aus dem Gel wird senkrecht zur Längsrichtung ein Stück von 1 - 3 mm Breite so herausgeschnitten, daß ein quer durch den gesamten Streifen reichender Graben entsteht, in den nun das Proteingemisch, mit gewaschener und getrockneter Stärke zu einem dickflüssigen Brei verrührt, eingebracht wird.

Diese Arbeitsweise ist besonders dann günstig, wenn das Proteingemisch wie bei Liquor, Harn usw. wenig konzentriert ist, sodaß eine größere Menge davon eingebracht werden muß.

2. Filterpapiermethode.

Hier wird das Gel in seiner ganzen Breite mit einer Rasierklinge oder einem feinen Draht durchschnitten; die Schnittländer werden mit einem Metallspatel etwas auseinandergeschoben, sodaß ein schmaler Spalt entsteht. In diesen werden 3 aufeinandergelegte, mit dem zu untersuchenden Material getränkte Filterpapierstreifen (Whatman Nr. 1) eingeführt. Ihre Höhe entspricht der des Gels (5 mm), sie enden jedoch beiderseits 1-2 mm vom Rande. Die Schnittländer werden dann an das Filterpapier ange-drückt, wobei darauf geachtet wird, daß sich zwischen Gel und Filterpapier keine Luftblasen befinden.

Diese Methode empfiehlt sich dann, wenn nur geringe Mengen des Untersuchungsmaterials zur Verfügung stehen; von Serum sind z.B. 70 - 80 mg ausreichend. Sie ist außerdem sehr gut geeignet, in ein und demselben Gel zu Vergleichszwecken verschiedenes Material nebeneinander, also unter den gleichen Bedingungen, laufen zu lassen.

Anschließend wird die Stärkegelplatte in eine Elektrophoresekammer (Elphor H) gelegt und mittels Filterpapierdochten (beiderseits 4 Lagen) eine Verbindung zwischen der in der Kammer befindlichen Brückenpufferlösung (0,3 m Borsäure + 0,06 m NaOH) und dem Gel hergestellt. Um das Gel während der Dauer der Elektrophorese einerseits vor Wasserverlust durch Austrocknung und andererseits vor dem Eindringen von Wasser, das eventuell vom Deckel abtropft, zu schützen, wird es mit einer dünnen Schicht von geschmolzenem Paraffin bedeckt, dessen Temperatur jedoch

nicht mehr als 45° betragen sollte. Ein direkter Kontakt des warmen Paraffins mit dem Untersuchungsmaterial wird durch vorheriges Abdecken desselben mit einem handgekneten dünnen Paraffinstreifen vermieden.

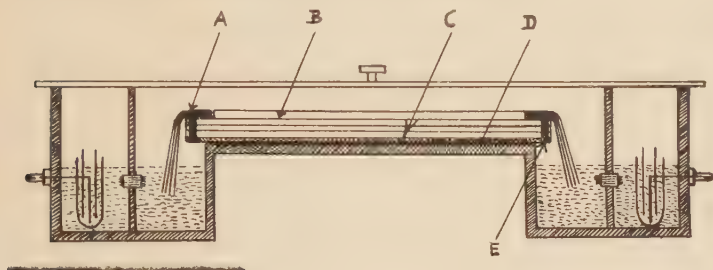


Abb. 1. Elektrophoresekammer, schematisch.
A = Filterpapierdöchte; B = Paraffinschicht;
C = 3 über die Metallstifte geschobene Kunststoffrahmen; D = Glasplatte; E = eingelassene Metallstifte.

Bedecken des Gels mit Parafilm war weniger günstig, weil dabei nicht vermieden werden konnte, daß sich an den Rändern zwischen Gel und Parafilm kleine Luftblasen und Wassertröpfchen festsetzten. Außerdem wurde dabei beobachtet, daß unter sonst gleichen Bedingungen bei den mit Parafilm bedeckten Streifen bei einer Laufzeit von z.B. 15 Stunden die Proteine eine längere Laufstrecke aufwiesen als bei den mit Paraffin bedeckten Streifen. Der Wegunterschied betrug bei den Albuminen 3 - 4 cm.

Nach der Elektrophorese wird durch zwei horizontale Längsschnitte die mittlere Schicht in einer Dicke von etwa 1,5 - 1,6 mm herausgeschnitten, da in dieser mittleren Schicht die einzelnen Proteinbanden am schärfsten sind.

Das Herausschneiden der mittleren Schicht des Gels ohne Dehnung und Stauchung wird durch eine nach den Angaben von MORETTI, BOUNIER und JAYLE angefertigte Form erleichtert. Sie besteht aus einer gläsernen Grundplatte mit 3 Kunststoffrahmen entsprechender Größe und Dicke. Der unterste Rahmen mit je einem an den 4 Ecken eingelassenen Metallstift ist auf die Glasplatte aufgeklebt. Die beiden anderen Kunststoffrahmen, die entsprechend gelocht sind, werden über die Metallstifte geschoben (Abb. 1).

Vor dem Schneiden wird nun zuerst der oberste Rahmen abgehoben und die oberste Schicht des Gels, die die nun verkleinerte Form überragt, durch einen horizontalen Längsschnitt entfernt. Nach Abheben des zweiten Rahmens kann die mittlere Schicht ebenso gewonnen werden. Diese wird in üblicher Weise mit einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz 10 B (Merck) in Methanol - dest. H_2O - Eisessig (50 : 50 : 10) gefärbt (2 Minuten genügen) und anschließend über ca. 16 Stunden mit dem eben erwähnten Lösungsmittelgemisch entfärbt.

B) Versuche zur quantitativen Erfassung elektrophoretisch getrennter Komponenten.

1. Direkte Photometrie.

Der gut (mindestens 12 Stunden) entfärbte Stärkegelstreifen wird in eine zum Sieden erhitzte 0,5%ige Essigsäurelösung mit 5% Glycerinzusatz eingelegt und das Gefäß sofort von der Flamme genommen. Bereits nach einigen Sekunden wird das Gel transparent. Der Behälter wird in Wasser von Raumtemperatur bis auf Handwärme abgekühlt. Inzwischen wird

1,5% Agar-Agar (feingepulvert, Fa. Merck) in 5% Glycerin-Wasser verflüssigt. Der Glycerinzusatz schützt vor Rissen, die sonst beim Trocknen den Streifen zerstören können.

Eine in den Rahmen des Elphor-Photometers passende Glasplatte wird mit einer dünnen Schicht dieser Agarlösung bedeckt und nach deren Verfestigung der transparente, etwas gequollene Stärkegelstreifen aufgelegt, mit flüssigem Agar bedeckt und zunächst bei 37°, abschließend bei 80° getrocknet. Man erhält so eine durchsichtige, dünne Stärke-Agar-Folie, die nun wie ein Papierelektrophoresestreifen, jedoch ohne bedeckende Glasplatte und ohne Transparenzflüssigkeit photometriert werden kann (Abb. 2). Der Stärkegelstreifen kann anschließend durch Einlegen in Methanol von der Glasplatte entfernt werden. Dabei wird die Agarschicht bereits nach einigen Minuten opak, und der Streifen kann nach Umschneiden mit einem Messer leicht von der tragenden Glasplatte abgezogen werden. Er ist durchsichtig, elastisch, knitterfest und kann mehrere Monate lang aufbewahrt werden, ohne daß er Veränderungen erleidet.

Bei anderen Versuchen wurden die ge- und entfärbten Stärkegelstreifen photographiert, auf transparentem Photopapier vergrößert und im Elphor-Gerät photometriert. Die Photometrie war ohne weiteres möglich, jedoch zeigte sich bei der Auswertung eine erhebliche Verschiebung der Relationen zwischen den einzelnen Fraktionen, weil die Härte des benutzten Photomaterials die prozentuale Wiedergabe der Farbwerte stark beeinflusst. Die Ergebnisse waren also nicht verwertbar.

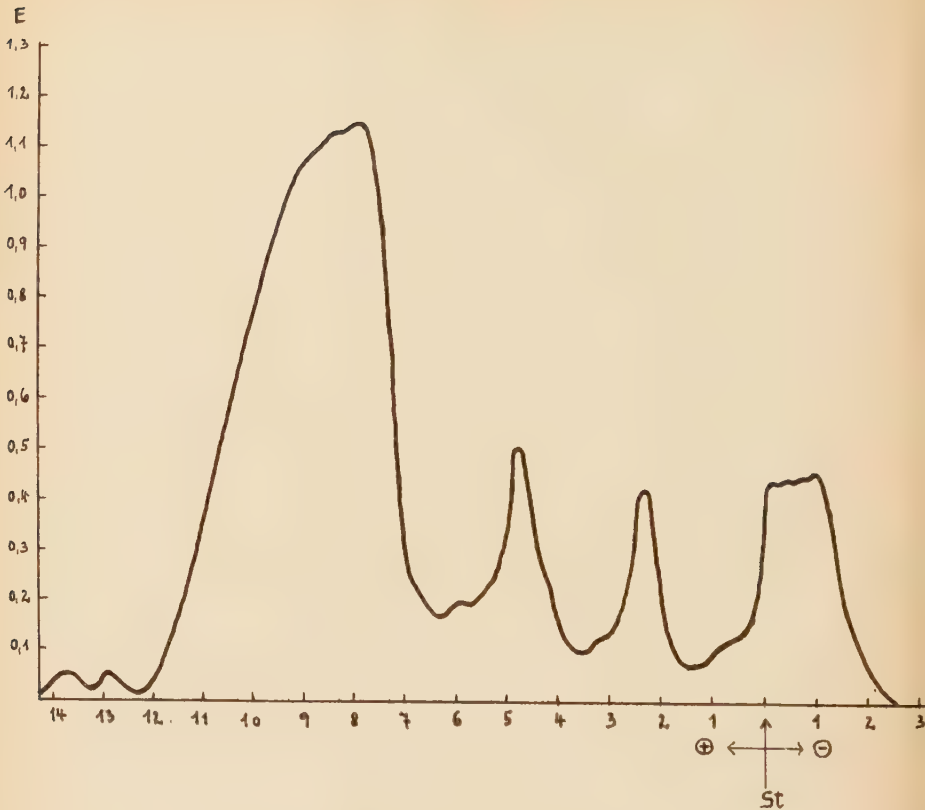


Abb. 2. Auswertung eines Serumstreifens mit dem Elphor- Photometer

Ordinate: Extinktion; Abszisse: cm Laufstrecke;
St = Startpunkt.

2. Quantitative Bestimmung nach Auflösung des Stärkegels.

Zunächst versuchten wir den Farbstoff aus dem Stärkestreifen ohne Auflösung des Trägermaterials, lediglich nach mechanischer Zerkleinerung zu eluieren. Dazu wurde der gut entfärbte, noch feuchte Streifen auf eine Glasplatte gelegt, die gewünschten Schnittstellen auf dem Streifen und

gleichzeitig auf einem danebengelegten Papier angezeichnet und der Streifen mit einer Rasierklinge zerlegt. Die Glasplatte mit den darauffliegenden Stücken wurde vorsichtig in eine Schale mit Aceton gebracht, dort unter gelegentlichem Schwenken für 30 Minuten belassen und anschließend bei 37° getrocknet. Nach Bestimmung des Trockengewichts der einzelnen Stücke des Streifens wurden diese 90 Minuten lang mit $n/20$ NaOH im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Elution erwies sich zwar als ausreichend, jedoch ist die benötigte Versuchsdauer so lang, daß der im Alkalischen unvermeidliche Extinktionsverlust zu hoch ist.

Auch verdünnte Sodalösung ($n/40$) führte zu erheblichem Extinktionsverlust bei wiederholten Messungen binnen 24 Stunden.

Bei Veronalpuffer pH 9,0 (0,03 m) trat zwar kein signifikanter Abfall der Extinktion binnen 24 Stunden ein, doch wird die Färbung der Globuline nicht ausreichend ausgewaschen.

Mit Bromphenolblau gefärbte Streifen (0,5% Bromphenolblau in 70% Äthanol- H_2O - gesättigt. $HgCl_2$), die mit dem üblichen Entfärber (Methanol- H_2O - Eisessig) behandelt worden waren, konnten durch 0,5% Sodalösung nicht vollständig eluiert werden, und die Färbung erwies sich gegenüber Aceton als nicht stabil. Außerdem werden bei diesem Verfahren schwache Proteinbanden auch bei Ausdehnung der Färbedauer auf 24 Stunden nicht genügend angefärbt.

Da alle diese Extraktionsversuche keine befriedigenden Resultate ergaben, wurde nun eine vollständige Auflösung des Gels angestrebt. Vorversuche mit gesättigter Pikrinsäure

und Trichloressigsäure zeigten - auch unter Erhitzen - binnen 10 Minuten keine vollständige Auflösung; doch lösten sich getrocknete Teile der Stärkegelplatte in heißer, reiner Ameisensäure. Die einzelnen getrockneten Segmente wurden in Reagenzgläser gewogen und mit je 4 ml Ameisensäure (p.a. 98-100%) 10 Minuten in ein siedendes

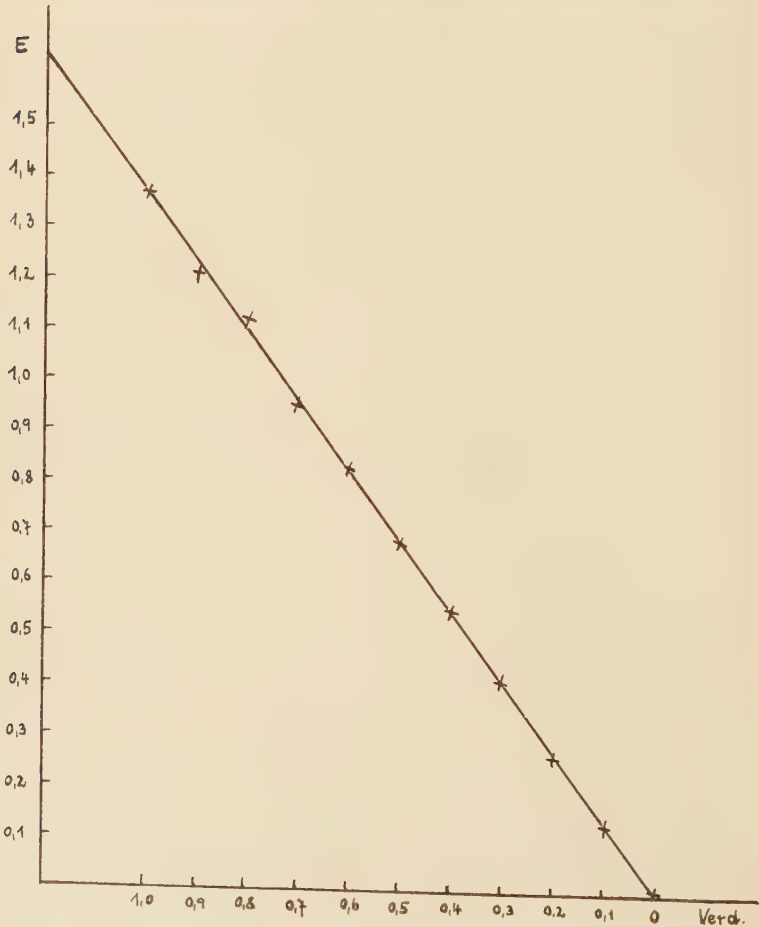


Abb. 3. Konzentrationsabhängigkeit der Extinktion von in Stärkegel gefärbtem Eiweiß (Serumalbuminfraktionen). Ordinate: Extinktion; Abszisse: Verdünnung.

Wasserbad gebracht. Nach 5 Minuten ist die Stärke bereits zum größten Teil gelöst; es empfiehlt sich aber, jedes Gläschen kräftig zu schütteln, um die sich am Boden ablagernden Schlieren mit der übrigen Lösung zu vermischen und dieses Schütteln nach einer Kochzeit von insgesamt 10 Minuten noch einmal zu wiederholen. Die Reagenzgläser werden anschließend abgekühlt und mit je 4 ml $n/1$ NaOH versetzt, wodurch ein Umschlag der zunächst grünen Farbe nach Blau erfolgt. Schließlich wird bei $630\text{ m}\mu$ gemessen. Die Farbe erwies sich als stabil; mehrmalige Messungen im Verlaufe von 24 Stunden ergaben keinen Extinktionsverlust. Das LAMBERT-BEER'sche Gesetz ist erfüllt (Abb. 3).

Wurde die Erhitzungsdauer zwischen 10 bis 30 Minuten variiert, so trat keine Änderung der Extinktion des freigesetzten Farbstoffs auf:

<u>Kochzeit</u>	<u>Extinktion</u>
10 Min.	0,590
15 "	0,594
20 "	0,607
30 "	0,597

Da die Dicke der Streifen nicht immer ganz gleichmäßig ist, erhält man genauere Resultate, wenn man die Extinktion auf das Trockengewicht bezieht. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und mg Trockengewicht des proteinfreien Streifens (Abb. 4).

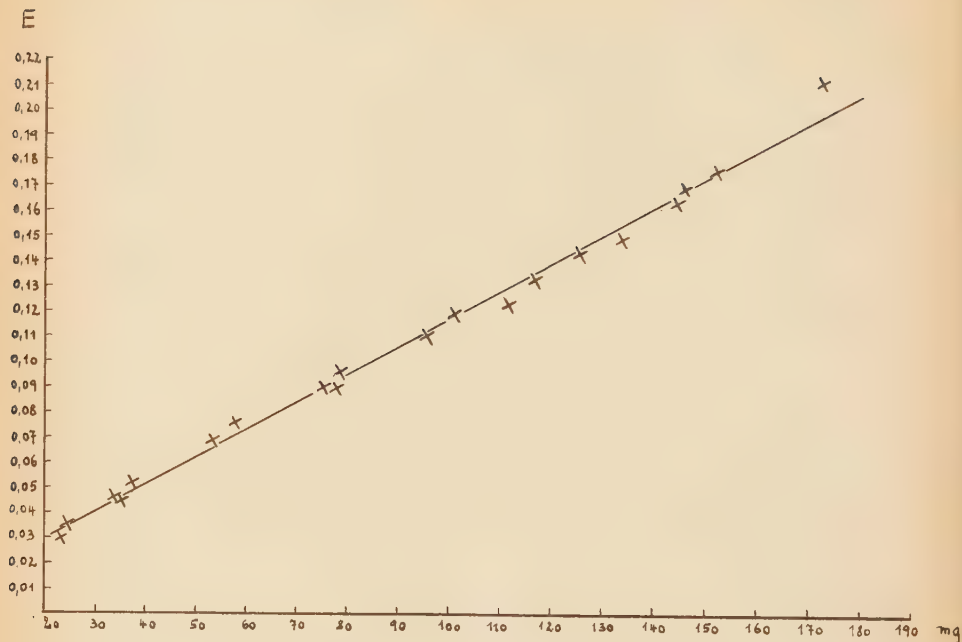


Abb. 4. Beziehung zwischen Trockengewicht und Extinktion proteinfreier gefärbter Stärkesegmente.

Die erhaltenen Werte werden nach Abzug des Leerwertes als Funktion der Wanderungsstrecke aufgetragen (Abb. 5). Bei ungerader Schnittführung läßt sich die Wanderungsstrecke nicht genau festlegen. Es ist dann besser, die dem Trockengewicht des Trägermaterials entsprechende Extinktion des Leerwertes von der Gesamtextinktion der jeweiligen Fraktion zu subtrahieren:

$$E_{\text{Prot.}} = E_{\text{Ges.}} - \frac{E_{\text{Leerw.}}}{P_{\text{Leerw.}}} \cdot P_{\text{Frakt.}}$$

- ($E_{\text{Prot.}}$ = Proteinanteil der Extinktion eines Stärkesegments
 $E_{\text{Ges.}}$ = Gesamtextinktion des Stärkesegments
 $E_{\text{Leerw.}}$ = Extinktion eines sicher proteinfreien Stärkesegments
 $P_{\text{Leerw.}}$ = Trockengewicht (mg) des photometrierten proteinfreien Stärkesegments
 $P_{\text{Frakt.}}$ = Trockengewicht (mg) des photometrierten proteinhaltigen Stärkesegments).

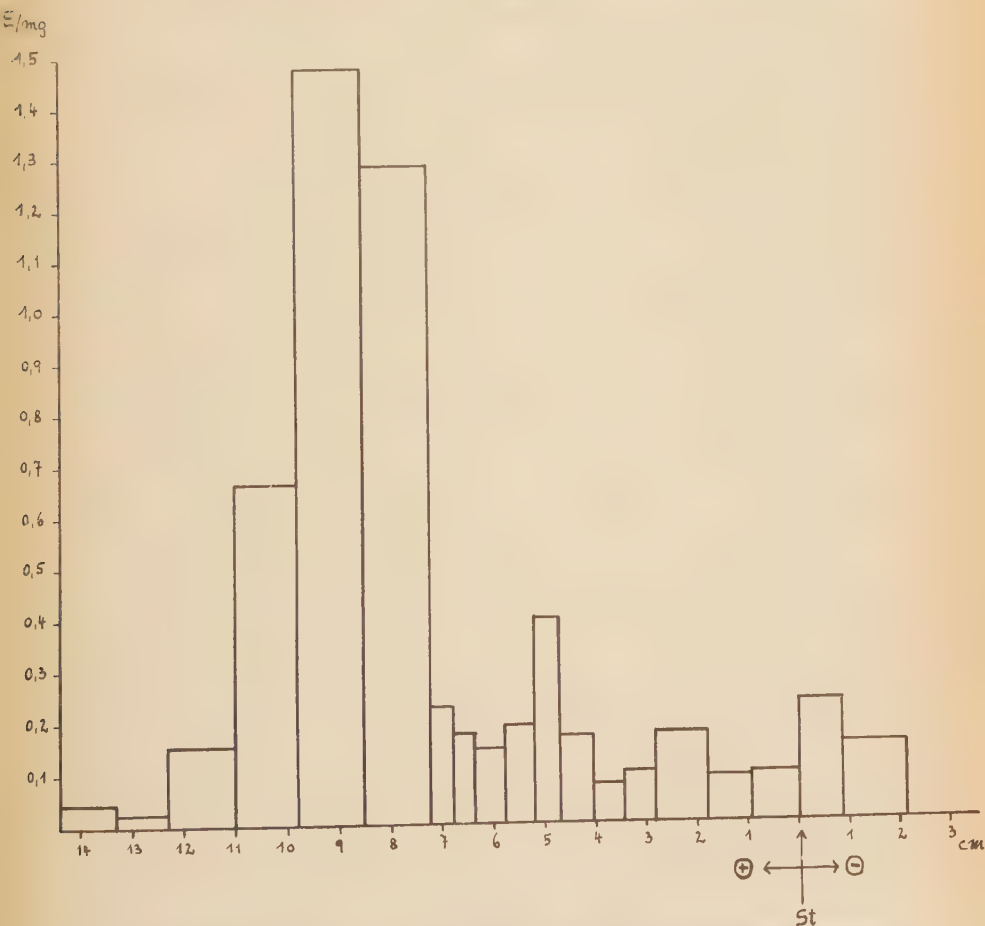


Abb. 5. Auswertung eines Serumstreifens mit dem Unicam-Spektrophotometer nach Auflösung des Trägermaterials.
 Ordinate: Extinktion/mg Trockengewicht; Abszisse: cm Laufstrecke; St = Startpunkt.

Zur Ermittlung der Streuung wurden 3 gleichartig behandelte Stärkegelstreifen (A, B, C) herangezogen, bei denen die gleichen Mengen einer 5%-igen Humanalbuminlösung mittels Filterpapier implantiert worden waren. Die nach der Elektrophorese gefärbten Streifen wurden dann entsprechend den einzelnen Fraktionen (I, II, III, IV) zerschnitten, getrocknet und gewogen, in Ameisensäure, wie unter B II 2 beschrieben, gelöst und photometriert. Außerdem wurden die Längen der einzelnen Segmente bestimmt.

Die Auswertung erfolgte nach 2 Verfahren:

I. Die auf mg Trockengewicht bezogene Extinktion wird nach

Abzug des Leerwertes mit der Länge des Segments multipliziert:

$$\left(\frac{\text{Extinkt. proteinhalt. Segment}}{\text{Trockengew. proteinh. Segment}} - \frac{\text{Ext. proteinfr. Segm.}}{\text{Trockengew. prot. fr. Segm.}} \right) \cdot \text{Länge.}$$

II. Die dem Trockengewicht des Trägermaterials entsprechende

Extinktion des Leerwertes wird von der Gesamtextinktion

subtrahiert:

$$\text{Gesamtextinktion} - \left(\frac{\text{Extinkt. d. proteinfr. Segm.}}{\text{Gewicht d. proteinfr. Segm.}} \cdot \text{Gewicht d. proteinhalt. Segm.} \right)$$

Wie aus Tabelle I und II hervorgeht, erhält man mit beiden Rechenverfahren übereinstimmende Ergebnisse. Die Zahl der bearbeiteten Streifen ist zwar zu gering zur Ermittlung der mittleren Abweichung, doch liegt diese - wie man aus dem Vergleich der Fraktionen in Streifen A - C ersehen kann - sicher in vertretbaren Grenzen.

Streifen	Fraktion	Segment Nr.	Länge	Trockengewicht mg	Extinktion bei 630 m	Berechnung nach I	Berechnung nach II
A	I	{ 1	2,4	245,26	1,234	10,40)	10,55)
		{ 2	2,2	243,30	2,300	19,20)	21,22)
	II	3	1,2	135,38	0,980	7,80	8,81
	III	4	0,75	80,53	0,357	2,78	2,98
	IV	5	0,6	67,31	0,192	1,27	1,43
		{ 6	0,9	102,31	0,209	1,18	1,34
	Rest	{ 7	0,9	90,40	0,114	0,48	0,48
		{ 8	0,8	69,92	0,072	0,24	0,21
	Leerwert	9	0,8	71,39	0,052	-	-
						43,35	47,02
B	I	{ 1	2,4	284,01	1,470	10,60)	12,54)
		{ 2	2,2	267,26	2,716	20,40)	25,12)
	II	3	1,25	153,77	1,010	6,72	8,33
	III	4	0,75	96,07	0,363	2,26	2,90
	IV	5	0,55	75,95	0,176	0,86	1,18
		{ 6	0,85	112,00	0,165	0,68	0,80
	Rest	{ 7	0,95	112,43	0,128	0,36	0,43
		{ 8	0,9	71,97	0,062	0,09	0,08
	Leerwert	9	0,8	92,41	0,076	-	-
						41,97	51,98
C	I	{ 1	2,4	251,18	1,280	10,30)	10,81)
		{ 2	2,15	228,43	2,660	23,50)	24,80)
	II	3	1,2	133,25	0,985	7,90	8,80
	III	4	0,7	84,84	0,348	2,32	2,81
	IV	5	0,65	60,58	0,152	1,12	1,04
		{ 6	0,8	99,45	0,166	0,70	0,87
	Rest	{ 7	1,0	104,84	0,122	0,37	0,39
		{ 8	0,85	99,60	0,079	0,00	0,16
	Leerwert	9	0,7	82,97	0,066	-	-
						46,21	49,68

Berechnung nach I
in Prozent

	A	B	C	Mittelwert
I	68,0	73,8	73,0	71,5
II	18,0	16,0	17,1	17,0
III	6,4	5,4	5,0	5,6
IV	2,9	2,05	2,4	2,45
Rest	4,7	2,75	2,5	-

Berechnung nach II
in Prozent

	A	B	C	Mittelwert
I	67,0	72,0	72,0	70,4
II	18,7	17,2	17,7	17,9
III	6,3	5,6	5,7	5,85
IV	3,0	2,3	2,1	2,47
Rest	5,0	2,9	2,5	-

Tab. II

C) Auftrennung einiger Proteingemische.

1. Humanalbumin.

Von einer 5%-igen Humanalbuminlösung (Behringwerke, "reinst") in physiol. NaCl wurden ca. 70 mg mittels Filterpapiermethode in das Stärkegel implantiert. Nach einer Elektrophoresedauer von 12 - 14 Stunden wurde regelmäßig eine Auftrennung des Humanalbumins in 4 Fraktionen gefunden während es papierelektrophoretisch als einheitlich erscheint (Abb. 6, 7, 8).



Abb. 6. Auftrennung von Humanalbumin durch Stärkegel-Elektrophorese in 4 Fraktionen nach einer Laufzeit von 13 Stunden.

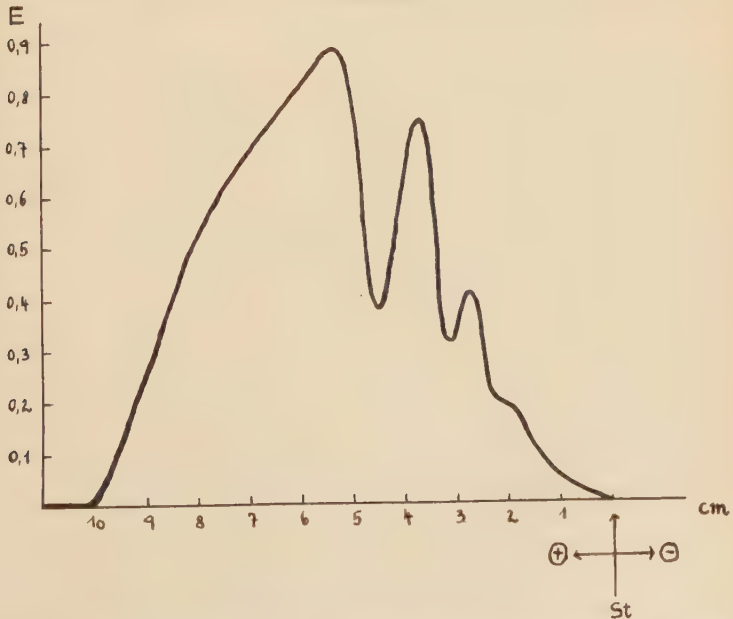


Abb. 7. Auswertung eines Humanalbuminstreifens mit dem Elphor-Photometer. Ordinate: Extinktion; Abszisse: cm Laufstrecke; St = Startpunkt.

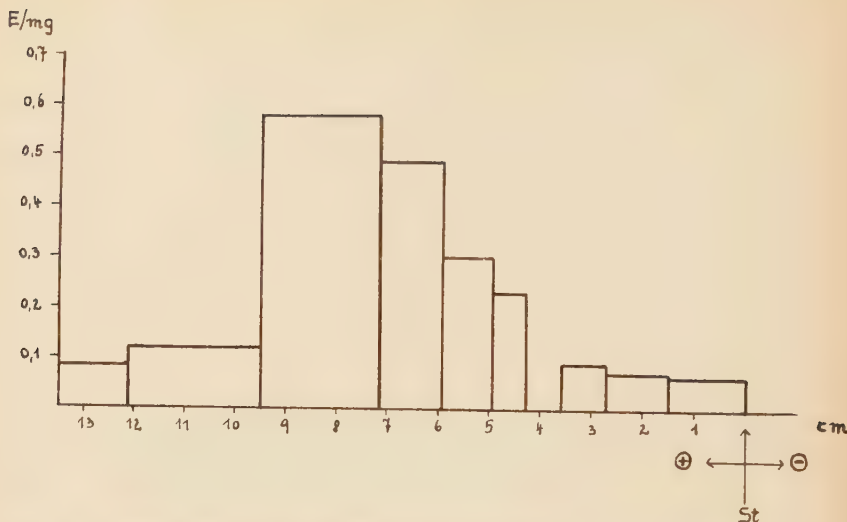


Abb. 8. Auswertung eines Humanalbuminstreifens mit dem Unicam-Spektrophotometer nach Auflösung des Trägermaterials. Ordinate: Extinktion/mg Trockengewicht; Abszisse: cm Laufstrecke; St = Startpunkt.

Ebensowenig konnte diese Auftrennung bei frischem Humanserum nach zweidimensionaler Elektrophorese beobachtet werden. Rinderserumalbumin (trocken, Behringwerke) ergab das gleiche Bild. Bezüglich der prozentualen Verteilung des Gesamtproteins auf die einzelnen Fraktionen vgl. Tab. I u. II.

2. Hundeserum.

Die von uns im Rahmen anderer Fragestellungen untersuchten Hundeseren eignen sich sehr gut zur Gegenüberstellung von papierelektrophoretischen und stärkegelelektrophoretischen Bildern; die unvorbehandelten gesunden Tiere wiesen individuelle Variationen beider Elektrophoresebilder auf.

Bedingungen der Papierelektrophorese:

Auf die mit Pufferlösung (Natriumacetat 0,048 m, Veronal-Natrium 0,048 m, HCl 0,0073 m; pH 8,55) getränkten und über einen Rahmen gespannten Filterpapierstreifen (Whatman Nr. 1, 4 x 30 cm), deren Enden in die gleiche Pufferlösung tauchten, wurden je 0,01 ml Serum aufgetragen und an die mit je 2 Streifen beschickte Kammer eine Spannung von 115 V angelegt. Nach 14 Stunden wurden die Streifen herausgenommen, getrocknet und in einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz 10 B in Methanol- Eisessig (9 : 1) gefärbt (GRASSMANN und HANNIG).

Bei der P a p i e r e l e k t r o p h o r e s e fiel auf, daß die Gamma-Globuline relativ schwach ausgebildet waren, was man beispielsweise auch bei Säuglingen findet. Das Verhältnis von β_1 zu β_2 war bei den einzelnen Tieren sehr verschieden; z.B. entwickelte das Serum von Hund III eine relativ starke β_1 - Bande, während sich bei den Hunden I, II und IV ein relativ starkes β_2 fand und die β_1 - und β_2 - Fraktionen von Hund V und VI etwa gleich stark erschienen. Unterschiede im Gehalt der α - Globuline waren wegen deren geringer absoluter Konzentration nicht genügend zuverlässig festzustellen oder auszuschließen.

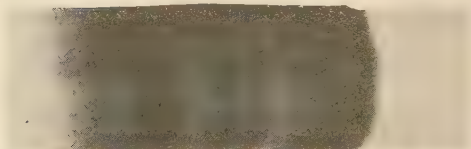
Bei der S t ä r k e g e l - E l e k t r o p h o r e s e fällt eine Ähnlichkeit der Anordnung und Intensität der Proteinbanden zwischen den Seren der Hunde I und V und III und IV auf. Das Serum des Hundes II entspricht weitgehend dem des Hundes I mit Ausnahme einer Fraktion, die in einem Fall stark und im anderen schwach ausgeprägt ist.

Irgendeine Korrelation zwischen den papierelektrophoretischen und den stärkegelelektrophoretischen Banden konnten wir nicht sehen (Abb. 9, 10).

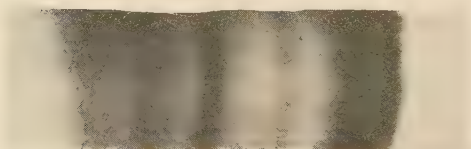
I



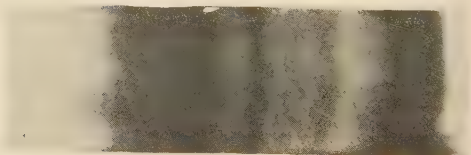
II



III



IV



V



VI

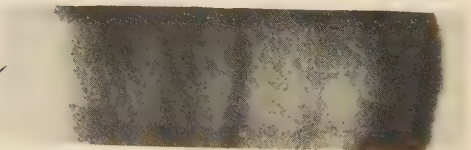
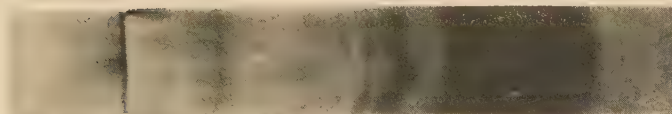


Abb. 9. Papierelektrophoresestreifen
der Seren verschiedener (I - VI) Hunde.

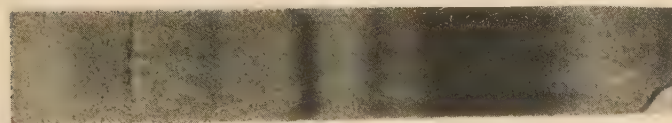
I



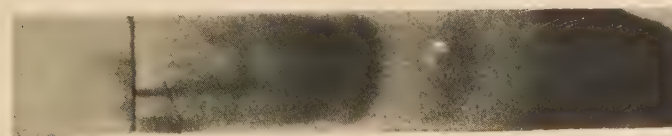
II



III



IV



V



VI

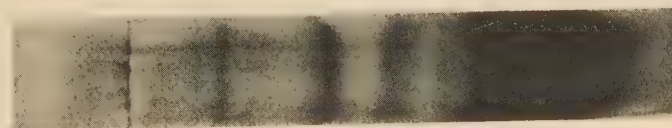


Abb. 10. Stärkegel-Elektrophoresestreifen der Seren
verschiedener (I - VI) Hunde.

3. Gasbrandgift.

Die pharmakologisch interessanten Komponenten der zentrifugierten Kulturflüssigkeit von *Clostridium Welchii*, Typ A (Stamm BP 6 K) wurden mit Methanol (35%) bei pH 4,8 bis 5,0 präzipitiert. Der mit 0,1 m Succinat, pH 6,0, aus dem Niederschlag dargestellte Extrakt (P I) enthielt 300 Lecithinaseeinheiten/ml. Er wurde durch Methanolfällung und Auflösung in NaCl-Lösung dreifach konzentriert (900 Lecithinaseeinheiten/ml; HABERMANN) und für die vorliegenden Versuche verwendet.

Die Elektrophorese wurde unter den bei III A angeführten Bedingungen angestellt; es wurden 3 Filterpapierstreifen mit je 70 - 80 mg Flüssigkeit implantiert. 4 Stärkegelplatten wurden unter den gleichen Bedingungen über 19 Stunden der Elektrophorese unterworfen. Diese Laufzeit erwies sich als am günstigsten. Vorversuche mit geringeren Laufzeiten brachten nur eine ungenügende Auftrennung; noch bei einer Laufzeit von 11 Stunden lagen die einzelnen Fraktionen sehr eng beieinander (Abb. 11).

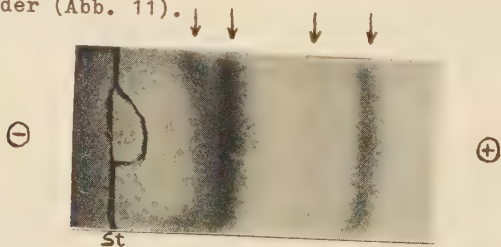


Abb. 11. Auftrennung von Gasbrandgift durch Elektrophorese in Stärkegel nach 11 Stunden Laufzeit.

Man erhält 4 anodenwärts wandernde Banden, von denen sich die zweite nur sehr schwach anfärbt, während die übrigen drei annähernd die gleiche Farbintensität aufweisen (Abb. 12).

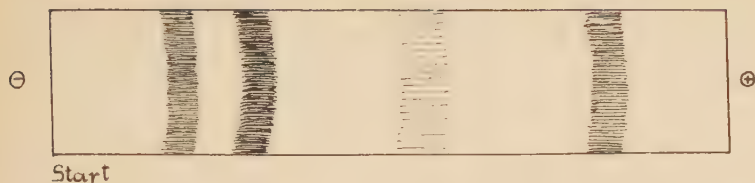


Abb. 12. Auftrennung von Gasbrandgift durch Elektrophorese in Stärkegel nach 19 Stunden Laufzeit (Strichzeichnung). Eine photographische Abbildung der Streifen war wegen der geringen Farbintensität der einzelnen Zonen nicht möglich; Bei der Photometrie (Abb. 13) treten diese deutlich hervor.

Zur quantitativen Auswertung wurde die ca. 1,5 mm dicke Mittelschicht verwendet, weil in dieser die Trennung am schärfsten ist.

Ein Streifen wurde nach der unter B 1 beschriebenen Methode transparent gemacht und direkt photometriert (Abb. 13).

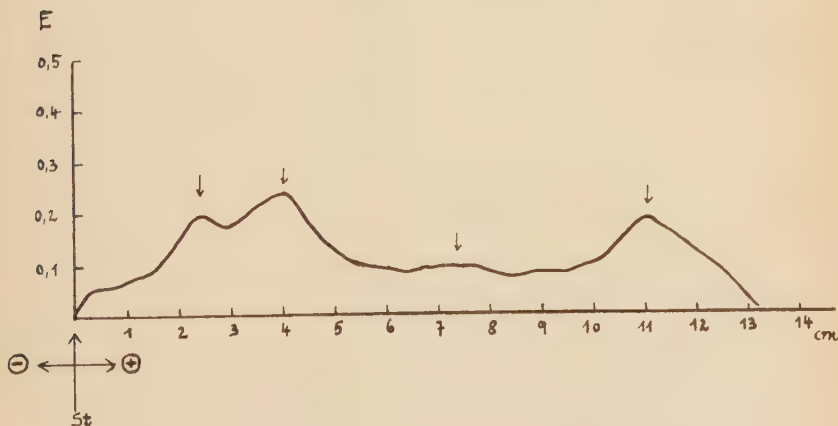


Abb. 13. Auswertung eines Gasbrandgiftstreifens mit dem Elphor-Photometer. Ordinate: Extinktion; Abszisse: cm Laufstrecke; St = Startpunkt.

Ein weiterer Streifen wurde nach Auflösung des Trägermaterials (s. unter B 2) im Unicam-Spektrophotometer in 1 cm-Küvetten bei 630 m μ photometriert (Abb. 14).

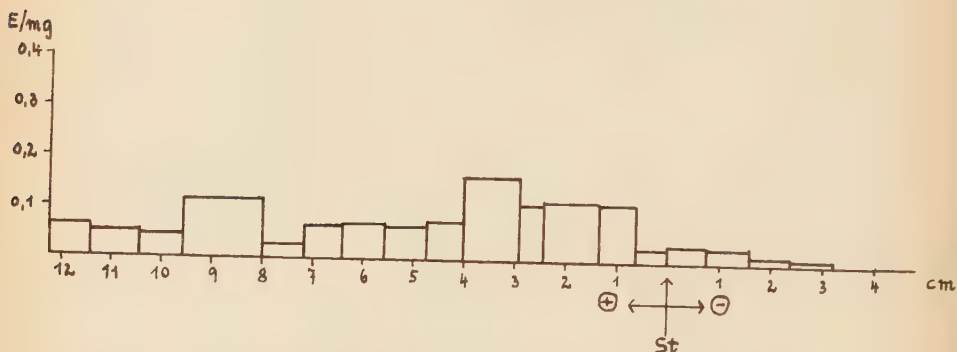


Abb. 14. Auswertung eines Gasbrandgiftstreifens mit dem Unicam-Spektrophotometer nach Auflösung des Trägermaterials. Ordinate: Extinktion/mg Trockengewicht; Abszisse: cm Laufstrecke; St = Startpunkt.

Andere Streifen dienten zur Aktivitätsprüfung der aufgetrennten Komponenten. Dazu wurde die Mittelschicht in 5 mm breite Segmente zerlegt, nachdem eine entsprechende Markierung auch auf der obersten Schicht angebracht worden war, die zu Vergleichszwecken in üblicher Weise gefärbt wurde. Die Anbringung einer solchen Markierung ist erforderlich, da das Gel durch den Färbeprozess um 5 - 10% schrumpft. Der Streifen ergab 39 Segmente, die in Zentrifugengläsern eingefroren wurden, um die Gelstruktur zu zerstören und das Herauslösen der Proteine zu erleichtern. Nach dem Auftauen wurde zerdrückt, mit je 2 ml physiol. NaCl-Lösung versetzt und nach 18 Stunden zentrifugiert. Mit dem Zentrifugat wurden nachstehende Aktivitätsprüfungen vorgenommen:

a) Lecithinase.

Bereitung von Eigelb: 1 Eigelb wird in 400 ml 0,15 m NaCl - 0,005 m Ca-Acetatlösung emulgiert, 30 Min. bei Zimmer-temperatur und ca. 2500 U/min. zentrifugiert, 10 g Bolus alba zugesetzt, zweimal durch Filterpapier gegossen und bei 0° aufbewahrt (ROTH und PILLEMER, vgl. HABERMANN).

1. Ansatz: 0,2 ml des Zentrifugats + 0,8 ml Veronalpuffer pH 6,8 + 0,25 ml Eigelbsuspension; 1 Stunde bei 37°.

Röhrchen Nr.

1 -	11 -	21 +++	Start -
2 -	12 -	22 +++	↓ 31 -
3 -	13 -	23 +++	32 -
4 -	14 -	24 +++	⊖ 33 -
5 -	15 -	25 +++	34 -
6 -	16 -	26 +++	35 -
7 -	17 (+) ?	27 ++	36 -
8 -	18 {+}	28 - ⊕	37 -
9 -	19 (+)	29 -	38 -
10 -	20 ++	30 - ↑	39 -

Beginn der Trübung in Röhrchen Nr. 25.

2. Ansatz: 0,1 ml des Zentrifugats + 1,9 ml Veronalpuffer pH 6,8 + 0,5 ml Eigelbsuspension.

Röhrchen Nr.	20 -	24 +
	21 -	25 ++
	22 -	26 ++
	23 ++	27 +

Ergebnis: Das Maximum der Lecithinase-Aktivität findet sich in Segment 23 - 27. Die Ausbeute ist jedoch sehr gering; 1 Lecithinaseeinheit führt noch in fünfzigfacher Verdünnung zu Eigelbtrübung unter den gewählten Bedingungen. Infolgedessen enthalten die Röhrchen 23 - 27 ca. 0,4 E/ml, insgesamt also 4 Einheiten. Eingesetzt wurden rd. 70 Einheiten, die Ausbeute beträgt also ca. 6%.

b) Ø - Hämolyse.

Bereitung der Erythrocytensuspension: Hammelblut wird durch Schlagen defibriniert, durch Watte gegossen und im Eisschrank aufbewahrt. Vor der Verwendung werden die Zellen dreimal mit NaCl-Lösung gewaschen (nach ROTH und PILLEMER; vgl. HABERMANN).

Puffer: Phosphatpuffer (0,038 m Na_2HPO_4 ; 0,032 m NaH_2PO_4 ; 0,078 m NaCl) pH 6,8.

Erythrocyten: Vom Erythrocytenbrei wird soviel zum Puffer gegeben, daß die Suspension in der 0,5 cm-Küvette im Unicam-Spektrophotometer bei 578 m μ eine Extinktion von 1,00 besitzt.

Ansatz: 0,1 ml des Zentrifugats + 0,1 ml einer m/60 neutralisierten Cysteinlösung in Phosphatpuffer pH 6,8; 15 Min. bei 37°; Zufügen von 2 ml Erythrocytensuspension; 30 Min. bei 37°.

Röhrchen Nr.

1 -	11 -	21 partiell hämolys.	Start -
2 -	12 -	22 fast tot.hämolys.	31 -
3 -	13 -	23 total hämolys.	32 -
4 -	14 -	24 partiell hämolys.	33 -
5 -	15 -	25 -	34 -
6 -	16 -	26 -	35 -
7 -	17 -	27 -	36 -
8 -	18 -	28 -	37 -
9 -	19 -	29 -	38 -
10 -	20 -	30 -	39 -

Ergebnis: Das Maximum der Ø - Hämolyse findet sich in Nr. 23, also etwas weiter anodisch als das der Lecithinase-Aktivität. Eine vollständige Trennung gelang nicht. Die Ausbeute liegt weit unter 1%.

c) Hyaluronidase.

Ansatz: 0,1 ml des Zentrifugats + 0,5 ml Hyaluronsäure
(1 : 400 in 0,85% NaCl) + 0,4 ml Phosphat - Citrat-
Puffer pH 6,0; 30 Min. bei 37°; dann Zusatz von
2 ml alkalischer Ferricyanidlösung (1,65 g $K_3(Fe(CN)_6)$
+ 10,6 g Na_2CO_3 ; H_2O ad 1 l); 15 Min. ins siedende
Wasserbad, abkühlen in Wasser von Raumtemperatur;
Zusatz von 5 ml Aqu. bidest.; bei 425 m μ ausmessen
Unicam-Spektrophotometer, 1 cm-Küvette). Eine Einheit
entspricht derjenigen Aktivität, welche die Extinktion
des Ansatzes um 0,60 (= rund 50%) vermindert.

<u>Röhrchen</u>	<u>Extinktion</u>	<u>Nr.</u>	<u>Ext.</u>	<u>Nr.</u>	<u>Ext.</u>
<u>Nr.</u>					
2	1,170	16	1,180	30	0,810
4	0,750	18	1,230	Start	1,210
6	0,860	20	1,120	31	0,965
8	0,880	22	1,180	33	1,110
10	0,713	24	1,140	35	1,140
12	0,830	26	0,668	37	1,240
14	0,880	28	0,640	39	1,270

Ergebnis: Die Hyaluronidase-Aktivität weist zwei flache
Maxima auf, von denen das eine von 4 - 14, das andere
von 26 - 31 reicht. Eine Angabe in Einheiten ist ohne
Extrapolation nicht möglich, weil die zur Errechnung er-
forderliche Extinktionsminderung von 0,60 in keinem Fall
erreicht wird, was bereits auf sehr geringe Ausbeuten hinweist.

d) Gelatinespaltung.

Gelatina alba "Merck" wird 3%-ig in Veronal - HCl - Puffer
pH 6,8, der 1 : 1 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt wurde,
gelöst.

Ansatz: 0,2 ml des Zentrifugats + 1,0 ml Gelatinelösung;
1 Stunde bei 37°; 10 Min. in Eiswasser; Feststellen
einer eventuellen Verflüssigung durch Neigen der
Gläser.

Von sämtlichen Röhrchen fand sich nur in Nr. 12 eine Ver-
flüssigung der Gelatine.

e) α -Hämolyse.

Bereitung der Erythrocytensuspension wie unter b), jedoch
wird statt des Phosphatpuffers Veronalpuffer verwendet:
4 Vol. (0,15 m NaCl + 0,015 m Ca-Acetat) + 1 Vol. 0,1 m
Veronalpuffer pH 7,6.

Ansatz: 0,1 ml des Zentrifugats + 2,0 ml Erythrocyten-
suspension; 30 Min. bei 37°; 15 Min. bei 0°.

Nach 3 Minuten zeigte sich lediglich in Röhrchen 23 eine
totale Hämolyse. Von dem in Röhrchen 23 enthaltenen
Zentrifugat hergestellte Verdünnungen von 1/2, 1/4, 1/8,
1/16 und 1/32 zeigten bei nochmaligem Ansatz keine Hämolyse
mehr.

Ergebnis: Eine Trennung von β -Hämolyse, α -Hämolyse und
Lecithinase findet nicht statt.

f) Testung der Aktivität an Mäusen.

Es wurden jeder Maus 0,01 ml des Zentrifugats pro kg
Gewicht i.v. gespritzt. Im Verlaufe von 6 - 8 Stunden star-
ben die mit dem Inhalt der Röhrchen 10 und 30 gespritzten
Mäuse. Es fand sich jedoch bei keinem der Tiere eine Hämaturie,
sodaß daran gezweifelt werden muß, ob die Todesursache ein
Gasbrandtoxin war. Es ist denkbar, daß die in den Lösungen
schwimmenden feinen Stärkepartikel als Emboli den Tod ver-
ursachten.

4. Bienengift.

Gereinigtes Bienengift wurde in 2%-iger Lösung der Elektrophorese in Stärkegel unterworfen. Zur Implantation diente die Stärkekornmethode. Nach einer Laufzeit von 6 Stunden konnte man deutlich 9 kathodische Fraktionen erkennen, die aber noch ziemlich eng beieinander lagen. Als Färbe- und Entfärbelösung benutzten wir hier Methanol-Eisessig; bei vorhergehenden Versuchen hatten wir nämlich gefunden, daß der Farbstoff aus den ersten beiden, rasch wandernden Fraktionen noch während des Entfärbens bis zu ihrem Verschwinden ausgewaschen wurde.

Nach einer Laufzeit von 13 1/2 Stunden war die Auftrennung wesentlich besser, und die einzelnen Banden lagen nicht mehr so dicht beisammen. Aber auch hier gaben die raschen ersten Fraktionen innerhalb weniger Stunden den Farbstoff an die Entfärbeflüssigkeit ab (Abb. 15).

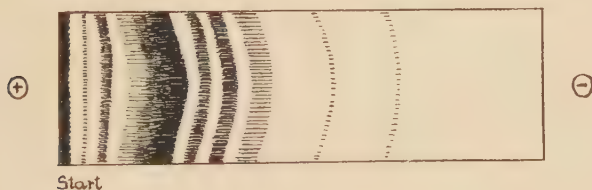


Abb. 15. Auftrennung von Bienengift durch Elektrophorese in Stärkegel in 9 kathodische Fraktionen nach einer Laufzeit von 13 1/2 Stunden (Strichzeichnung).

IV. Besprechung.

Das erste Ziel unserer Arbeit war, quantitative Verfahren zur Ermittlung der bei Stärkegel-Elektrophorese erhaltenen Proteinzonen aufzufinden, denn die bisher bekannten derartigen Verfahren befriedigten nicht.

Ähnlich wie bei der Papierelektrophorese und -chromatographie

sind grundsätzlich zwei Prozeduren möglich: Die direkte Photometrie gefärbter Zonen auf dem Elektrophoresestreifen oder die Photometrie des zuvor eluierten Farbstoffs.

Wann das eine oder das andere Verfahren angewandt werden soll, muß von Fall zu Fall entschieden werden; beide besitzen Vorzüge und Nachteile.

Durch die direkte Photometrie erhält man anschaulichere Kurvenzüge. Ist aber die Dicke des Streifens - senkrecht zur Wanderungsrichtung gemessen - nicht überall gleichmäßig, so ist der gemessene Wert falsch. Es ist nun ohne komplizierte Vorkehrungen schwierig aus dem elastischen Gel eine Schicht von 1,5 mm mit der notwendigen geringen Dickentoleranz herauszuschneiden und diese ohne Dehnung und Stauchung durch die verschiedenen Stufen der Verarbeitung zu führen. Sind die Banden leicht durchgebogen oder etwas gegen die Vertikale geneigt, so erscheinen sie bei senkrechter Projektion auf die Photozelle weniger scharf. Liegen zwei derartige bogenförmige Fraktionen sehr eng beieinander, so ist die Trennung der Maxima nur unvollständig, und das Unterlegen von Gauß'schen Kurven unter den Kurvenzug wird problematisch.

Die Photometrie nach Auflösung des Trägermaterials bietet die Möglichkeit, eng beieinanderliegende Maxima zu trennen und deren Krümmungen mit der Schnittführung zu folgen. Die durch ungleichmäßige Dicke einzelner Zonen des Streifens entstehenden Fehler kann man dadurch vermeiden, daß man die gemessenen Extinktionen auf das Trockengewicht des Trägermaterials bezieht. Man erhält aber keine glatten Kurvenzüge;

gelegentlich ist eine Darstellung der Maxima nicht möglich, wenn zwei Fraktionen so eng beieinander liegen, daß das dazwischen liegende Minimum nicht gesondert herausgeschnitten werden kann.

Bei sorgfältiger Einhaltung der Versuchsbedingungen erscheinen die hier aufgeführten Methoden als brauchbar zur quantitativen Auswertung von Stärkegel-Elektrophogrammen.

Unser zweites Problem war die Untersuchung einiger biochemisch bzw. pharmakologisch interessanter Proteingemische.

Gasbrandgift und Bienengift können mittels Stärkegel-Elektrophorese in zahlreiche Fraktionen aufgetrennt werden. Über deren pharmakologische Bedeutung können jedoch einstweilen keine genauen Angaben gemacht werden, da die Ausbeute bisher zu gering war.

Inwieweit die von uns erstmals beobachteten Stärkegefraktionen beispielsweise den papierelektrophoretischen Bienengiftfraktionen von NEUMANN und HABERMANN oder den säulenelektrophoretischen Gasbrandgiftfraktionen (HABERMANN) entsprechen, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Jedenfalls bietet die Elektrophorese in Stärkegel die Möglichkeit, Stoffe, die bei anderen zonenelektrophoretischen Verfahren einheitlich erscheinen, noch weiter aufzutrennen. Allerdings ist es in solchen Fällen notwendig, die Natur der getrennten Komponenten zu klären und die Entstehung von Artefakten während der Elektrophorese auszuschließen. Auch an verschiedene physicochemische

Zustände des gleichen Stoffes muß gedacht werden; FRANGLEN und GOSSELIN konnten nachweisen, daß Bromkresolgrün als Mischung von 2 Polymeren oder 2 Gruppen von Polymeren vorliegt, die durch Stärkegel-Elektrophorese unterschieden werden können. Möglicherweise verhalten sich die von uns als inhomogen befundenen handelsüblichen S e r u m a l - b u m i n e ähnlich.

V. Zusammenfassung.

Es werden zwei Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinfractionen nach Stärkegel-Elektrophorese angegeben.

Der in üblicher Weise gefärbte Trägerstreifen kann durch Erhitzen in glycerinhaltiger verdünnter Essigsäure transparent gemacht, nach Einbettung in Agar-Agar getrocknet und wie ein Papierstreifen photometriert werden.

Andererseits können die den Proteinfractionen entsprechenden Abschnitte des Streifens getrocknet und nach Lösung in heißer Ameisensäure photometriert werden.

Gereinigtes, bei Papierelektrophorese als einheitlich erscheinendes Serumalbumin von Rind und Mensch liefert in Stärkegel 4 Fraktionen.

Bienengift trennt sich unter unseren Bedingungen in zahlreiche, kathodisch wandernde Fraktionen auf.

Gasbrandgift liefert mehrere durch Elektrophorese in Stärkegel unterscheidbare Komponenten, die sämtlich anodisch wandern. Die verschiedenen pharmakologischen bzw. biochemischen Aktivitäten lassen sich jedoch bisher aus dem Gel nur zu einem geringen Prozentsatz wiederge-

winnen, sodaß ihre exakte Lokalisation noch unsicher ist.

Herrn Professor Dr. Dr. W. N e u m a n n danke ich
für die mir an seinem Institut gebotene Arbeitsmöglichkeit.

Herrn Privatdozenten Dr. E. H a b e r m a n n
danke ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie
für seine wertvollen Hinweise bei der Ausführung der Arbeit.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ASHTON, G. C. : Nature 179, 824 (1957)
- ASHTON, G. C. : Nature 180, 917 (1957)
- FINE, J. M., und
E. WASZCZENKO-Z. : Nature 181, 269 (1958)
- FINE, J. M., und
R. GREYSSEL : Nature 183, 392 (1959)
- FRANGLÉN, G. T., und
C. GOSSELIN : Nature 181, 1152 (1958)
- GRASSMANN, W., und
K. HANNIG : Z. f. Physiol. Chem. 290, 1 (1952)
- HABERMANN, E. : Arch. exp. Path. u. Pharmakol., i. Dr.
- HABERMANN, E., und
B. SZOPA : Klin. Wschr., i. Druck
- HARRIS, H.,
E. B. ROBSON, und
M. SINISCALCO : Nature 182, 1324 (1958)
- LATNER, A. L., und
A. H. ZAKI : Nature 180, 1366 (1957)
- MORETTI, Y.,
G. BOUNIER, und
M. F. JAYLE : Bull. soc. chim. biol. 39, 593 (1957)
- NEUMANN, W., und
E. HABERMANN : Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 222,
367 (1954)
- OWEN, A., und
C. GOT : Clin. chim. acta 2, 588 (1957);
zit. n. Chem. Abstr. 52, 17362 (1958)
- PERT, J. H., und
H. KUTT : Proc. of soc. exp. biol. a. med. 99,
181 (1958)
- POULIK, M. D. : Nature 177, 982 (1956)
- POULIK, M. D., und
E. POULIK : Nature 181, 354 (1958)
- POULIK, M. D., und
O. SMITHIES : Biochem. J. 68, 636 (1958)
- ROTH, F. B., und
L. PILLEMER : J. Immunol. 70, 533 (1953)

- SMITHIES, O. : Biochem. J. 61, 629 (1955)
- SMITHIES, O. : Nature 175, 307 (1955)
- SMITHIES, O., und
N. F. WALKER : Nature 176, 1265 (1955)
- SMITHIES, O., und
M. D. POULIK : Nature 177, 1033 (1956)
- SMITHIES, O., und
N. F. WALKER : Nature 178, 694 (1956)
- TURBA, F. : Chromatographische Methoden in der
Proteinchemie, Bln., Gött.,Heidelbg.(1956)
- VESSELINOVITCH, S. D. : Nature 182, 665 (1958)

L E B E N S L A U F

Am 12. November 1920 als Tochter des Oberzollsekretärs August Gröschl und seiner Ehefrau Margarete, geb. Rebitzer, in Aussig/E. geboren, besuchte ich dortselbst die fünfklassige Deutsche Volksschule und anschließend in den Jahren 1931 bis 1939 das Städt. Reform-Realgymnasium, wo ich am 15.6.1939 die Reifeprüfung ablegte.

Im August 1939 heiratete ich den Brauereibesitzer Ernst Kirchner, der im Januar 1945 gefallen ist.

Infolge der Ausweisung der Deutschen aus dem Sudetenland kam ich 1946 nach Bayern. Hier arbeitete ich von 1946 bis 1950 als Sprechstundenhilfe in einer Arztpraxis und anschließend über ein Jahr lang als Angestellte in einem Industriebetrieb.

Im Wintersemester 1951/52 begann ich an der Universität Würzburg mein Medizinstudium, wo ich im Juli 1954 die Ärztliche Vorprüfung ablegte. Im Januar 1957 heiratete ich den Facharzt für Augenkrankheiten Dr. R. Szopa. Mein Staatsexamen bestand ich im Juni 1958. Vom September 1958 bis einschließlich Februar 1959 arbeitete ich am Pharmakologischen Institut der Universität Würzburg.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Brunhilde Szopa

